

## Hilfe für die Züchter

### Erkennung widerstandsfähiger Salatpflanzen durch eine neue Bildanalyse-basierte Schnellmethode

Falscher Mehltau ist in vielen gärtnerischen Kulturen ein Problem und seine Bekämpfung äußerst schwierig. Bei Salat werden resistente Sorten angebaut, um den Ertrag zu sichern. Aufgrund des Vorkommens einer Vielzahl an physiologischen Rassen, die der pilzliche Erreger bildet, wird in der Züchtung nach immer neuen Resistenzen gesucht. Im Züchtungsprozess sind daher Methoden erforderlich, die eine schnelle, einfache und sichere Auswertung von Pflanzen hinsichtlich ihrer Befallsfreiheit ermöglichen. Daher sollte geprüft werden, ob die bisherigen visuellen Auswerteverfahren durch neuere leistungsfähige Methoden ersetzt werden können. Hierfür wurde die Chlorophyllfluoreszenzbildanalyse (CFBA) im Wirt-Pathogen-System Salat/

*Bremia lactucae* erprobt und erfolgreich für die objektive Schnellerkennung widerstandsfähiger Salatpflanzen optimiert und angepasst.

Im Salatanbau hat *Bremia lactucae*, der Erreger des Falschen Mehltaus, wegen seines ausgeprägten Schadenspotentials große Bedeutung. Die Salatzüchtung steht vor der großen Herausforderung, in kurzer Zeit Sorten zu entwickeln, die gegenüber den neu auftretenden Erregerrassen widerstandsfähig sind. Eine Vielzahl an Einzelpflanzen muss gegenüber den verschiedenen Erregern auf ihre Resistenz geprüft werden. Die momentan in der Züchtungspraxis eingesetzten visuellen Auswerteverfahren sind jedoch arbeits- und zeitintensiv. In enger Zusammenarbeit untersuchen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des Leibniz-Instituts für Agrartechnik

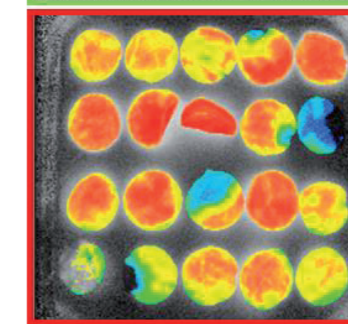
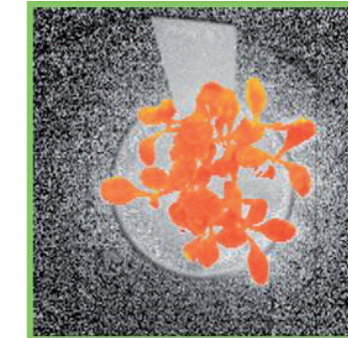
#### Auswerteverfahren

Visuell



neue  
Methode

CFBA



Züchter

Entscheidungshilfe  
für den Züchter



resistente  
Sorte

anfällige  
Sorte

Abbildung 1: Die Analyse der mit CFBA ermittelten photochemischen Effizienz soll dem Züchter helfen, nicht befallene von befallenen Pflanzen schnell zu unterscheiden

Potsdam-Bornim e.V. und des Julius Kühn-Institutes eine Möglichkeit, Infektionen der Salatpflanzen schnell nachzuweisen. Da der Erreger das Wirtsgewebe im Verlauf der Infektion schädigt, ist die Analyse der Photosyntheseaktivität eine gute Möglichkeit zur Erkennung von *Bremia lactucae*-Infektionen. Außerdem können resistente und anfällige Salatlinien frühzeitig und objektiv unterschieden werden. In diesem Zusammenhang bietet sich der Einsatz der CFBA als eine berührungslos und zerstörungsfrei einsetzbare, d. h. nicht-invasive Methode zur Charakterisierung metabolischer Veränderungen kranker Pflanzen an.

Ein einfach bestimmbarer Fluoreszenzparameter ist die potenzielle photochemische Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ , variable Fluoreszenz/maximale Fluoreszenz). Er kann die Photosyntheseaktivität erfassen und damit eine frühzeitige Schädigung des Photosyntheseapparates der Pflanze durch den Erreger aufzeigen (Abb. 1).

Im Rahmen des vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft geförderten Projektes „SalatBild“ wurde die CFBA-Methode zur Unterscheidung von Befall - Nicht-Befall und folglich von Anfälligkeit bzw. Resistenz genutzt. Hierfür wurden die in der Züchtung üblichen Resistenzprüfmethoden an Sämlingen bzw. auf Blattscheiben angewendet. In die Untersuchungen wurden Kopfsalat- und Batavialinien bzw. -sorten ein-

bezogen, die sich in ihren Resistenzen gegenüber dem Falschen Mehltau unterscheiden. In den Versuchen wurden verschiedene Erregerrassen sowie ein Feldisolat eingesetzt.

#### Prüfung an Sämlingen

Mit diesem Test können rassenspezifische Resistenzen, also die Widerstandsfähigkeit einer Salatsorte gegenüber einer bestimmten Erregerrasse, getestet werden. Dazu wurden Sämlinge im Alter von sieben Tagen mit einer Erregerlösung übersprüht und kultiviert.

Die Bewertung der Resistenz gegenüber Falschem Mehltau erfolgte zum einen visuell anhand der Sporenbildung (Sporulation) des Pilzes auf den Keimblättern und zum anderen durch CFBA-Messungen. Immer dann, wenn der Pilz nicht oder nur spärlich Sporen auf den Keimblättern bildet, besteht Resistenz. Für die Erarbeitung von Algorithmen war es zunächst notwendig, mit beginnendem Infektionsprozess täglich die CFBA-Messungen an den Sämlingen durchzuführen. Für die Unterscheidung von infizierten und nicht infizierten Pflanzen konnten geeignete Parameter mittels CFBA validiert werden. Diese zeigten, dass bereits nach vier bis acht Tagen eine Detektion der Infektion möglich ist. Damit können anstelle der visuellen Auswertung durch Analyse der photochemischen Effizienz stark anfällige

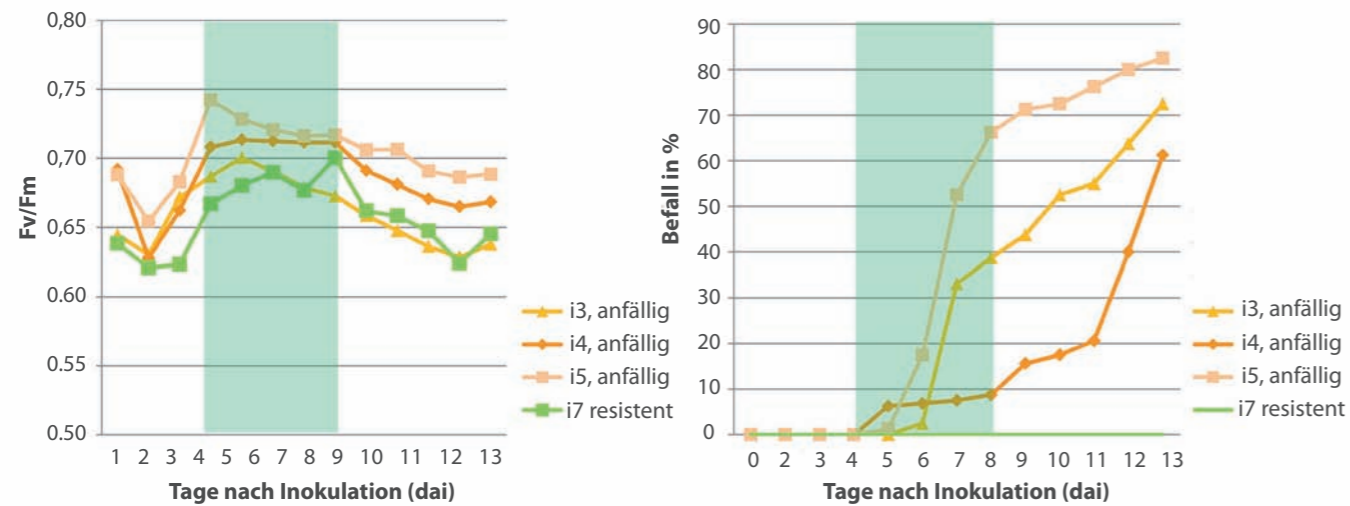


Abbildung 2: Photochemische Effizienz (Fv/Fm, variable Fluoreszenz/maximale Fluoreszenz) (links) und Befallsentwicklung (rechts) bis 13 Tage nach Inokulation bei ausgewählten Sorten. Eine Unterscheidung zwischen resistenten und anfälligen Sorten kann zwischen dem 4. und 8. Tag nach Inokulation erfolgen (Mittelwertdarstellung, je Sorte n = 8)

und resistente Sorten voneinander unterschieden werden. Bei stark befallenen Sämlingen nahm die photochemische Effizienz zwischen dem 4. und dem 8. Tag nach Infektion ab, bei Pflanzen der resistenten Sorten stieg der Wert dagegen leicht an (Abb. 2).

Bei einem langsameren Infektionsverlauf, wie er bei der Salatlinie i4 mit unter zehn Prozent Befall bezogen auf die gesamte Blattfläche nach vier bis acht Tagen vorlag, ist eine Einschätzung mit der CFBA unter den gegebenen Testbedingungen in dem markierten Zeitraum nicht gegeben. Erfolgen die Messungen wie in den Testreihen nicht täglich, sondern zu den als optimal herausgefundenen Zeitpunkten, ist das Testsystem insgesamt stabiler. Folglich ist bei anfälligen Sorten mit höheren Befallswerten zu rechnen, die sich dann wieder mit CFBA erfassen lassen. Dies wird derzeit in weiteren Untersuchungen erprobt und die Methode hinsichtlich ihrer Praxisanwendung überprüft. Insgesamt zeigte sich, dass die in der CFBA als anfällig bewerteten Sorten bzw. Linien auch nach visueller Einschätzung anfällig waren. Derzeit wird geprüft, inwieweit die Übertragbarkeit des Ansatzes auf die Testung verschiedener Rassen gelingt.

#### Prüfung auf Blattscheiben

Mit der Testung auf Blattscheiben aus ausdifferenzierten Blättern lassen sich weitere Resistenzeigenschaften erfassen. So können z. B. Eigenschaften der Salatsorte wie die Blattkonsistenz eine Rolle spielen, die unabhängig von der Erregerasse zu einer Abwehr führen. Der Blattscheibentest ist wesentlich aufwändiger in seiner



Abbildung 3: Ausstanzen von Blattscheiben

Durchführung durch die Anzucht der Jungpflanzen sowie das Ausstanzen und Auflegen der Blattscheiben auf eine Unterlage (Abb. 3).

Um die CFBA-Ergebnisse mit dem visuell geschätzten Befallsgrad vergleichen zu können, wurde die photochemische Effizienz (Fv/Fm-Werte) über jedes Fluoreszenzbild gemittelt und verglichen bzw. die Blattscheiben einzeln bildanalytisch ausgewertet. Die Auswertung berücksichtigt, dass pilzinferierte erkrankte Stellen niedrige Fv/Fm-Werte besitzen. Eine Häufung von Bildpixelwerten im unteren Wertebereich lässt auf eine verringerte Vitalität (geschädigte, anfällige Sorten) und eine Häufung im oberen Bereich auf eine hohe Vitalität (gesunde, resistente Sorten) der Blattscheiben schließen.

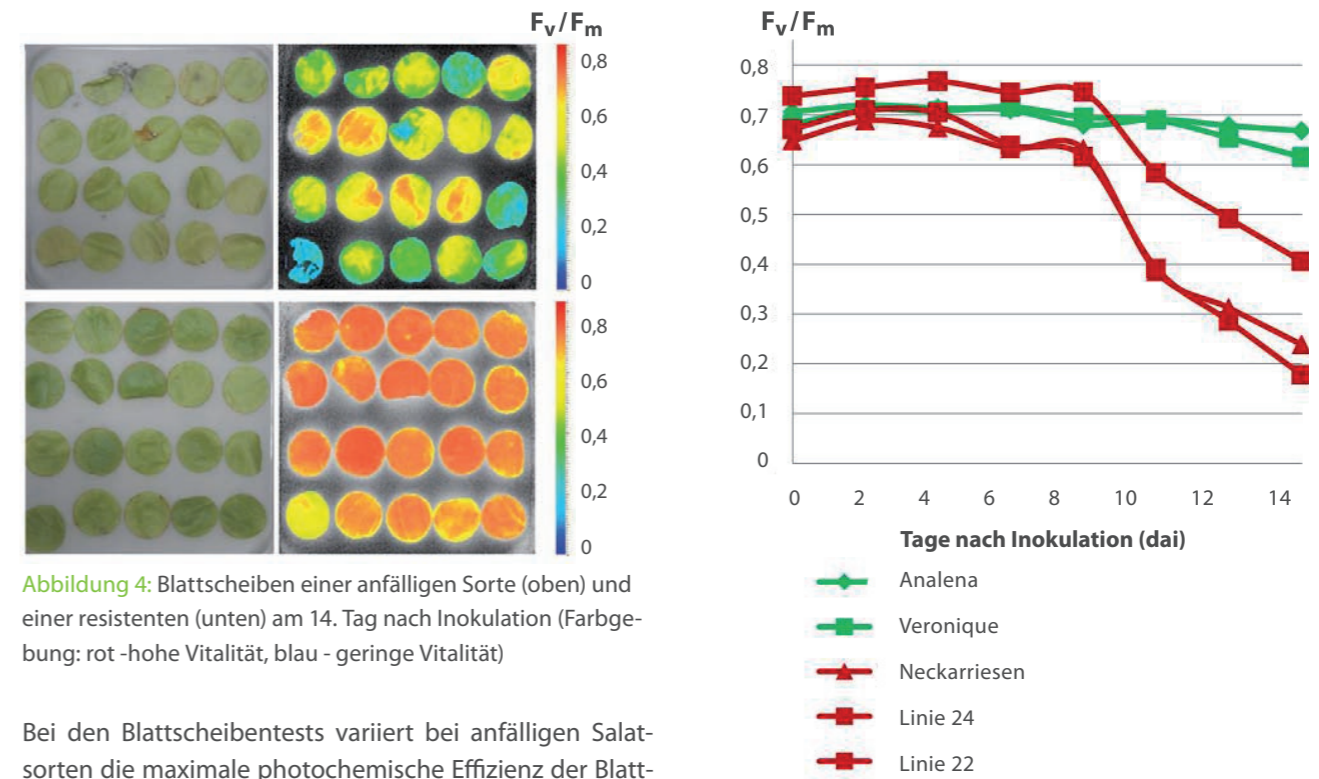


Abbildung 4: Blattscheiben einer anfälligen Sorte (oben) und einer resistenten (unten) am 14. Tag nach Inokulation (Farbgebung: rot - hohe Vitalität, blau - geringe Vitalität)

Bei den Blattscheibentests variiert bei anfälligen Salatsorten die maximale photochemische Effizienz der Blattscheiben mit Fortschreiten der *Bremia*-Infektion sehr stark (Abb. 4, oben); bei resistenten Sorten (Abb. 4, unten) ist der Wert dagegen relativ gleichmäßig.

Mit Hilfe der mehltauinfizierten Blattscheiben sind anfällige Salatsorten ab dem 10. Tag nach Inokulation detektierbar (Abb. 5).

Die deutlich sichtbaren Unterschiede in Höhe und lokaler Verteilung der Fv/Fm-Werte können mithilfe der hinterlegten Pixelwerte analysiert und klassifiziert und damit eine Beurteilung der Anfälligkeit gegenüber Falschem Mehltau erzielt werden. So lag der prozentuale Anteil niedriger Fv/Fm-Werte bei den Kontrollen und resistenten Kopfsalatsorten mit weniger als fünf Prozent deutlich unter denen der anfälligen Sorten (15 Prozent).

#### Die nächsten Schritte

Am Beispiel der Wirt-Pathogen-Beziehung Salat/*Bremia lactucae* konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der CFBA eine objektive und automatisierbare Erkennung von Pilzkrankheiten möglich ist. Bei Salat war hiermit Falscher Mehltau bereits nach vier bis acht Tagen detektierbar, bei visueller Auswertung nach sieben bis maximal 14 Tagen. Für jedes Wirt-Pathogen-System sind jedoch spezifische Auswert-Algorithmen zu erarbeiten und auf die jeweilige Erregerinfektion abzustimmen. Um die Ergebnisse in die praxistaugliche Anwendung zu bringen, müssen daher weitere Pflanzen-Schadereger-Kombinationen untersucht werden. Für ein einsatzreifes Gerätesystem

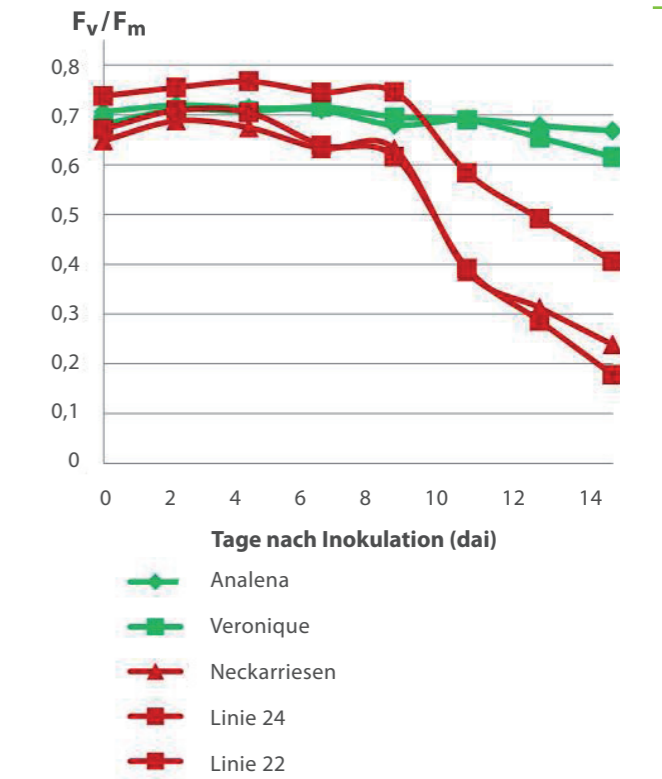


Abbildung 5: Verlauf von Fv/Fm bei inokulierten Blattscheiben anfälliger (rot) und resistenter Salatsorten (grün)

ist es außerdem nötig, die Chlorophyllfluoreszenz-Aufnahme- und Analysetechnik entsprechend anzupassen. So ist z. B. denkbar, durch geeignete fahrbare Gerätesysteme und durch Optimierung der Aufnahmetechnik in kürzerer Zeit mehr Pflanzen untersuchen zu können, als es momentan möglich ist. Die hier vorgestellte Technik bietet Möglichkeiten, den gesamten Prozess in der Auswertung zu automatisieren und damit den Prüfaufwand erheblich zu senken.



Dr. Elke Bauriegel<sup>1</sup>, Dr. Werner B. Herppich<sup>1</sup>,  
Dr. Ute Gärber<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB), Abteilung Technik im Gartenbau

<sup>2</sup> Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, Kleinmachnow

E-Mail: ebauriegel@atb-potsdam.de